



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1717634 A1

(51)5 C 12 P 19/42, C 07 H 23/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4699525/13

(22) 05.06.89

(46) 07.03.92. Бюл. № 9

(71) Львовский государственный универси-
тет им. Ив. Франко

(72) С.А. Елисеев, Н.М. Дацюк, О.И. Подо-
пригора и Т.В. Выговская

(53) 668.394(088.8)

(56) Патент ВНР № 167245,

кл. С 07 D 55/62, 1976.

Патент США № 4383110,

кл. С 07 H 15/12, 1984.

Канопкайте С. Кобаламины - Вильнюс:
Макслас, 1978, с. 65-66.

(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА
В₁₂

(57) Изобретение относится к микробиоло-
гии, биохимии и физхимии, в частности к

2

способу выделения витамина В₁₂ из клеток
пропионовых бактерий. Цель изобре-
тения - увеличение выхода витамина и упр-
ощение способа. Способ выделения
витамина В₁₂ включает культивирование
пропионовых бактерий, отделение
культуральной жидкости, обработку био-
массы для разрушения клеток, экстракцию
фенол-хлороформенной смесью и получе-
ние готового продукта, при этом перед экс-
трагированием клетки обрабатывают
0,5-3%-ным раствором анионного детер-
гента додецилсульфата натрия в щелочной
среде при pH 9-10 в течение 30 мин. Обра-
ботку биомассы осуществляют путем замо-
раживания клеток при температуре
(-4)-(-12°C) и выдержки в течение 1 ч после-
дующим оттаиванием. 1 з.п. ф-лы, 3 табл.

Изобретение относится к микробиоло-
гии, биохимии и физхимии, в частности к
способу выделения витамина В₁₂ из клеток
пропионовых бактерий - промышлен-
ных продуцентов витамина В₁₂

Известны способы получения витамина
В₁₂, заключающиеся: в фотохимическом
преобразовании кофермента В₁₂ или окси-
кобаламина и их алкильных производных в
витамин В₁₂; в аэробной ферментации арт-
робактерий с последующим выделением из
биомассы в результате гидролиза и феноль-
но-хлороформенной экстракции витамина
В₁₂; в выделении и очистке витамина В₁₂ на
ионообменной смоле, содержащей сополи-
мер дивинилбензола и стирола; в кислотном
гидролизе бактериальной массы с последу-

ющим выделением витамина В₁₂ в результате
фенольно-хлороформенной экстракции.

Недостатки приведенных способов вы-
деления витамина В₁₂ заключаются в доро-
говизне оборудования и реактивов, при-
меняемых для очистки, дороговизне
многокомпонентных питательных сред для
выращивания микроорганизмов, необходи-
мости энергетических затрат для проведе-
ния гидролиза.

Наиболее близким по технической сущ-
ности является способ выделения витамина
В₁₂ из биологического материала, заключа-
ющийся в том, что клетки микроорганизмов,
содержащие кобаламины, отделяют от куль-
туральной жидкости путем центрифугирова-
ния, заливают 5-6 объемами воды и в

(19) SU (11) 1717634 A1

течение 5-10 мин автоклавируют при pH 4-5 в присутствии 4 мг% KCN. После центрифугирования супернатант подщелачивают до pH 8-9, к нему добавляют 4 мг% KCN и выдерживают в темноте в течение 1 ч для перевода кобаламина в дицианидную форму. Их извлекают путем многократной экстракции небольшими порциями фенол-хлороформенной смеси (1:1). Из смеси кобаламина переводят в воду при добавлении 1,5 объема хлороформа и 0,75 объема н-бутанола. Следы хлороформа и бутанола удаляют посредством обработки содержащего этиловым эфиром. Концентрацию кобаламинов в водном растворе определяют спектрофотометрически.

Недостатком известного способа является громоздкость, длительность самого технологического процесса выделения витамина B₁₂, требующего использования дополнительного оборудования и затрат электроэнергии (автоклавирование), многократность экстракции ведущая к продолжительному процессу получения продукта. Кроме того, недостатком способа является низкий выход витамина B₁₂ в связи с тем, что экстракция фенол-хлороформенной смесью не ведет к полному извлечению витамина B₁₂. Невысокий выход витамина B₁₂ получается в результате количественных его потерь при термической денатурации.

Цель изобретения — увеличение выхода витамина и упрощение способа.

Поставленная цель достигается тем, что согласно способу, включающему культивирование пропионовых бактерий, отделение культуральной жидкости от биомассы, обработку биомассы для разрушения клеток, экстракцию фенол-хлороформенной смесью и получение готового продукта, перед экстрагированием разрушенные клетки обрабатывают 0,5-3%-ным раствором анионного детергента додецилсульфата натрия в щелочной среде при pH 9-10 на протяжении 0,5 ч.

Кроме того, разрушение клеток осуществляется путем замораживания их при температуре (-4)–(-12)°C и выдержкой в течение 1 ч с последующим оттаиванием.

Предлагаемый способ отличается от известного совокупностью признаков: обработка 0,5-3%-ным раствором анионного детергента додецилсульфата натрия при pH 9-10 в течение 0,5 ч, для разрушения клеток используют процесс замораживания при температуре (-4)–(-12)°C и выдержку в течение 1 ч с последующим оттаиванием.

Широкое применение в микробиологических экспериментах, связанных с извле-

чением и солюбилизацией гидрофобных и встроенных в структуру бактериальных клеток белков тейхоевых кислот, липидов и липополисахаридов нашли детергенты. В основе солюбилизирующего действия детергентов лежит их амфифильная природа, позволяющая им взаимодействовать и с гидрофобными и гидрофильными участками белков, либо других соединений, обладающих амфипатическими свойствами. В ряде случаев поверхностно-активные вещества выступают в качестве специфических экстрагирующих реагентов.

Известно, что обработка детергентами вызывает диспергирование клеточных стенок, нарушение целостности наружных слоев клетки, увеличение проницаемости, разрыхление и обезвоживание клеточной стенки вплоть до полного или частичного растворения и выхода внутриклеточного содержимого в среду. Но ни один из используемых детергентов не образует комплексного соединения с кобаламином.

Однако неизвестно, что именно DDCNa вызывает специфическую солюбилизацию витамина B₁₂ из клеток бактерий.

Итак, предложено использовать в качестве детергента додецилсульфат натрия, вызывая специфическую солюбилизацию витамина B₁₂ из клеток бактерий.

В основе обнаруженного явления может лежать специфичность взаимодействия отрицательно заряженного неорганического фрагмента молекулы детергента с положительно заряженным атомом кобальта в молекуле витамина B₁₂, что не исключает и других вероятных механизмов. Пропионовые бактерии синтезируют кроме витамина B₁₂ такие соединения, как флавины, менахины, цитохромы, порфирины и т.д. Однако после обработки клеток DDCNa в щелочной среде из бактерии выходит витамин B₁₂, а не какое-либо из перечисленных соединений. Даже в специальной литературе, посвященной способам разрушения бактерий, нет сведений о применении DDCNa для дезинтеграции клеток при щелочных pH, как наиболее эффективном методическом подходе.

При щелочных значениях pH (9 или 10) изменяется поверхностный заряд клеток бактерий, что позволяет алкильным частям молекул DDCNa взаимодействовать с гидрофобными участками клеточных стенок бактерий и приводит к их дезинтеграции. В результате взаимодействия щелочного раствора DDCNa с суспензией бактериальных клеток при перемешивании окончательное значение величины pH становится нейтральным, что в свою оче-

редь обуславливает стабильность выхода витамина В₁₂. При взаимодействии сильно щелочных детергентов с витамином В₁₂ образуется соединение кобаламиновой природы, снижающее pH до нейтрального, которое в дальнейшем не приводит к разрушению витамина В₁₂. Существующие способы выделения витамина В₁₂ проводятся в средах с слабощелочным и нейтральным значением pH, что приводит к неполному извлечению витамина В₁₂ из клеток и низкому его выходу.

Снижение pH раствора до 9,0 либо увеличение свыше 10,0 снижает выход витамина В₁₂ из клеток за счет физико-химических изменений, происходящих с молекулами детергента. Более низкий выход витамина В₁₂ наблюдается и при снижении концентрации DDCNa менее 0,5% или увеличении ее свыше 3% за счет снижения числа мицелл детергента, способных специфически взаимодействовать с молекулами кобаламинов.

Выбор pH и концентрации детергента подтверждаются данными, приведенными в табл. 1.

Замораживание — процесс известный, но в предлагаемом способе он ускоряет разрушение клеток. В этих температурных границах (-4)–(-12)°C происходит кристаллизация свободной воды в клетке. Ослабевают межмолекулярные связи в клеточной стенке, облегчается доступ DDCNa к внутреннему содержимому клетки, а именно к веществам кобаламиновой природы.

Обработка 0,5–3%-ным раствором DDCNa, который взаимодействует с кобаламинами, ведет к образованию соединений, легко экстрагируемых органическими растворителями. Такое соединение с другими детергентами неионной (гритон X-100, 114, 305, твин 20, 40, 60, 65, 80), катионной (катамин АВ, цетилтриметиламмонийбромид, цетилтриметилпиридинийхлорид), анионной (холат и дезоксихолат натрия) природы, обладающих общеизвестным свойством — дезинтегрировать микроорганизмы, только DDCNa оказался способным специфически извлекать витамин В₁₂ из бактериальных клеток (табл. 1).

Пример 1. Культуру пропионовых бактерий (штамм *Propionibacterium shermanii* MY-512) выращивают на синтетической среде. На 3-е сутки культивирования вносят 5,6-диметилбензамидозол (5,6-ДМБ). На 5-е сутки культивирования клетки отделяют от культуральной жидкости центрифугированием при 5000 об/мин, затем промывают физраствором и замораживают

при -4°С в течение 1 ч. К 3 г замороженных клеток добавляют 8 мл 0,5%-ного раствора DDCNa при pH 10,0 и перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего центрифугируют при 8000 об/мин 15 мин. Осадок промывают 2 мл 0,5%-ного раствора DDCNa при pH 10,0, центрифугируют в том же режиме, а супернатанты сливают. В супернатант добавляют 2 мг% KCN, встряхивают и выдерживают в темноте 20 мин. Витамин В₁₂ извлекают путем многократной экстракции небольшими порциями фенол-хлороформенной смеси (1:1). Из смеси витамин переводят в воду при добавлении 1,5 объема хлороформа и 0,75 объема н-бутанола. Следы хлороформа и бутанола удаляют посредством обработки содержимого этиловым эфиром. Концентрацию витамина В₁₂ определяют спектрофотометрически при длине волны 361 нм.

Параллельно проводят выделение витамина В₁₂ по известному способу с тем же количеством бактериальных клеток. Содержание витамина В₁₂ в экстрактах из клеток пропионовых бактерий: по известному способу — $480 \pm 0,2$ мкг/г сухого веса клеток; предлагаемым способом — $760 \pm 0,1$ мкг/г сухого веса клеток. Выход витамина В₁₂ при выделении предлагаемым способом выше на 57–58%.

Пример 2. Выращивание пропионовых бактерий, отделение клеток, промывание физраствором и замораживание их проводят по примеру 1. К 3 г замороженных клеток добавляют 8 мл 3%-ного DDCNa при pH 9,0 с последующим перемешиванием на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют при 8000 об/мин 15 мин. Осадок промывают 3%-ным раствором DDCNa при pH 9,0, центрифугируют, добавляют 2 мг% KCN, встряхивают, выдерживают в темноте 30 мин. Витамин В₁₂ извлекают путем многократной экстракции небольшими порциями фенол-хлороформенной смеси (1:1), затем операции проводят по примеру 1. Выход витамина 110% по сравнению с известным способом.

Пример 3. Выращивание пропионовых бактерий, отделение клеток, промывание физраствором и замораживание их проводят по примеру 1. К 3 г замороженных клеток добавляют 8 мл 4%-ного DDCNa при pH 11,0 с последующим перемешиванием на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют при 8000 об/мин 15 мин. Осадок промывают 4%-ным DDCNa при pH 11, цен-

трифугируют, добавляют 2 мг % KCN, встряхивают в темноте 30 мин. Затем операции проводят по примеру 1. Выход витамина B₁₂ составляет 37,5% по сравнению с известным способом.

Пример 4. Выращивание пропионово-кислых бактерий, отделение клеток, промывание физраствором и замораживание их проводят по примеру 1. К 3 г замороженных клеток добавляют 8 мл 0,3%-ного DDCNa при pH 7,0 с последующим перемешиванием на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют при 8000 об/мин 15 мин. Осадок промывают 0,3%-ным раствором DDCNa при pH 7,0, добавляют 2 мг % KCN, встряхивают и выдерживают в темноте 30 мин. Затем операции проводят по примеру 1. Выход витамина 64,6% по сравнению с известным способом.

Пример 5. Выращивание пропионово-кислых бактерий, отделение клеток, промывание физраствором и замораживание проводят по примеру 1. К 3 г замороженных клеток добавляют 8 мл 0,50% ного тритона X-100 при pH 10,0 и перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют, добавляют 2 мг % KCN, встряхивают, выдерживают в темноте 30 мин. Затем операции проводят по примеру 1. Выход витамина B₁₂ не наблюдают.

Пример 6. Выращивание пропионово-кислых бактерий, отделение клеток, промывание физраствором и замораживание проводят по примеру 1. К 3 г замороженных клеток добавляют 8 мл 0,5%-ного цетиламмонийбромида (ЦТАБ) при pH 10,0 и перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют при 8000 об/мин 15 мин. Осадок промывают 0,5%-ным ЦТАБ при pH 10,0, центрифугируют, добавляют 2 мг % KCN, встряхивают, выдерживают в комнате 30 мин. Затем операции проводят по примеру 1. Выход витамина B₁₂ не наблюдают.

Пример 7. Выращивание пропионово-кислых бактерий, отделение клеток, промывание физраствором и замораживание проводят по примеру 1. К 3 г замороженных клеток добавляют 8 мл 0,5%-ного холата натрия при pH 20,0 и перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют при 8000 об/мин 15 мин. Осадок промывают 0,5%-ным холатом натрия при pH 10,0, центрифугируют, добавляют 2 мг % KCN, встряхивают, выдерживают в

темноте 30 мин. Затем операции проводят по примеру 1. Выход витамина B₁₂ не наблюдают.

Для сравнения данные, полученные под влиянием pH и концентрации DDCNa на выход витамина B₁₂ из клеток *Propionibacterium freudenreichii* subs. *shermanii*, сведены в табл. 1.

Во всех приведенных примерах используют известную синтетическую среду состава, г/л:

(NH ₄) ₂ SO ₄	6
K ₂ HPO ₄	7
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
Глюкоза	40
Цитрат Na	0,5
CoCl ₂ ·2H ₂ O	5 мг %
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1 мг %
Растворы витаминов и микроэлементов	По 1 мл/л
Дистиллированная вода	До 1,0 л.

Данные о специфической солибилизирующей активности DDCNa характерны не только для мутантного штамма MY-512, отличающегося высоким уровнем кобаламиногенеза, но и других штаммов (MY-3, исходного природного штамма Познанского); табл. 2.

Конкретные значения концентрации DDCNa и величины pH обусловлены физико-химическим состоянием самого вещества, так как его солибилизационные свойства обнаруживаются только при определенных значениях концентрации и pH.

В табл. 3 приведена зависимость содержания витамина B₁₂ от типа детергента (все детергенты используются в концентрации 0,5% при pH 10,0).

Как видно из приведенных в табл. 3 данных, предлагаемый способ выделения витамина B₁₂ существенно отличается от известных и обладает явными преимуществами: отсутствие процесса гидролиза сокращает время получения витамина, а отсутствие нагрева уменьшает затраты энергии.

Формула изобретения

1. Способ выделения витамина B₁₂, включающий культивирование пропионово-кислых бактерий, отделение культуральной жидкости, обработку биомассы для разрушения клеток, экстракцию фенол-хлороформенной смесью и получение готового продукта, отличающийся тем, что, с целью увеличения выхода витамина и упро-

щения способа, перед экстрагированием клетки обрабатывают 0,5-3%-ным раствором анионного детергента додецилсульфата натрия в щелочной среде при pH 9-10 в течение 30 мин.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что обработку биомассы осуществляют путем замораживания клеток при температуре (-4)-(-12)°C и выдерживания в течение 1 ч с последующим оттаиванием.

Таблица 1

Способ	Величина pH	Концентрация DDCNa, %	Содержание витамина B ₁₂ , мкг/г сухой клетки	Выход, %
Предлагаемый по примеру				
1	10,0	0,5	760 ± 0,1	158
2	9,0	3,0	528 ± 0,2	110
3	11,0	4,0	180 ± 0,3	37,5
4	7,0	0,3	310 ± 0,1	64,5
Известный	4,0-5,0	-	480 ± 0,2	100

Таблица 2

Штамм	Величина pH	Концентрация DDCNa, %	Содержание витамина B ₁₂ , мкг/г сух. клеток	Выход, %
Познанский	10	0,5	471 ± 0,1	98,13
	9	3,0	389 ± 0,2	81,04
	11	4,0	153 ± 0,1	31,88
	7	0,3	236 ± 0,3	49,17
МУ-3	10	0,5	473 ± 0,1	98,54
	9	3,0	391 ± 0,1	81,46
	11	4,0	157 ± 0,1	32,71
	7	0,3	210 ± 0,2	43,75
МУ-512	10	0,5	760 ± 0,1	158,33
	9	3,0	528 ± 0,2	110
	11	4,0	180 ± 0,3	37,5
	7	0,3	310 ± 0,1	64,58
Известный	4-5	0,3	480 ± 0,2	100

10

Таблица 3

Тип детергента	Содержание витамина B ₁₂ , мкг/г сухого веса клеток
Неионные:	
третон х-100 (пример 5)	-
третон х-114	-
третон х-305	-
твины 20, 40, 60, 65, 80	-
Катионные:	
ЦТПХ, катамин АВ	-
ЦТАБ (пример 6)	-
Анионные:	
холат натрия (пример 7)	-
дезоксиколат натрия	-
DDCNa	760 ± 0,1

Редактор И Дербак	Составитель Н Афанасьева Техред М Моргентал	Корректор Э. Лончакова
Заказ 853	Тираж	Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР 113035, Москва, Ж 35, Раушская наб., 4/5		
Производственно издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101		